

Title	Identification of the Substrate Interaction Region of the Chitin-Binding Domain of Streptomyces griseus Chitinase C using NMR spectroscopy
Author(s)	赤木, 謙一
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46456
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 あか 赤 ぎ 木 けん 謙 いち 一

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 20046 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

理学研究科生物科学専攻

学 位 論 文 名 Identification of the Substrate Interaction Region of the Chitin-Binding Domain of *Streptomyces griseus* Chitinase C using NMR spectroscopy
(NMR を用いたキチナーゼ C のキチン結合ドメインとキチンとの相互作用解析)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 阿久津秀雄

(副査)

教 授 後藤 祐児 助教授 池上 貴久

論 文 内 容 の 要 旨

キチンは *N*-アセチル-*D*-グルコサミンが β -1,4-グリコシド結合によって結合した直鎖状の高分子で、甲殻類や昆虫の外骨格、菌類の細胞壁などを構成している。地球上における総生産量はセルロースに匹敵して1千億トンとも2千億トンとも言われている。この豊富な炭素源を利用するため、微生物はキチナーゼを菌体外へ分泌してキチンを分解し栄養源にし、一方、植物は真菌による侵食に抵抗するためキチナーゼを分泌し自らを守っていると考えられている。

当研究に使用した放線菌 *Streptomyces griseus* 由来キチナーゼ C は、キチン結合ドメインに細菌型、キチン分解活性ドメインに植物型のドメインをもつキメラ的なキチナーゼとして初めて同定された。当研究の目的は、このキチン結合ドメインの溶液中での構造を決定し、可溶性オリゴキチンとの相互作用の解析から、このキチン結合ドメインがどのように基質を認識するかを立体構造の観点から明らかにすることである。

^{15}N 、 ^{13}C の安定同位体でラベルしたキチン結合ドメインを発現、精製し、一連の多核共鳴多次元 NMR 測定によって、各原子の化学シフト値の帰属を行った。帰属された化学シフト情報を用いて、立体構造計算を行う際に必要な水素原子核間距離情報である NOE 信号の解析を行い、さらに、二面角予測プログラム Talos を用いて二面角度情報を得た。また、水素結合情報を得るためにアミド水素の溶媒重水素との交換実験を行った。これらの結果、590 個の距離制限 (1 個のジスルフィド結合制限、15 個の水素結合制限を含む) 及び 92 個の二面角度制限 (スカラー結合定数の測定から得られた 5 個の χ_1 角度制限を含む) をもとに、構造計算プログラム cyana を用いた torsion angle dynamics 法により立体構造を計算した。その結果、N 末端、C 末端を除いた 49 アミノ酸残基の主鎖の重原子 (N, C α , C β) の重ね合わせにおいて RMSD が $0.19 \pm 0.05 \text{ \AA}$ とよく収束した構造を得ることに成功した。得られた構造は 2 つの β シート部分から成るコンパクトな楕円形状を有しており、分子表面には 2 つのトリプトファン側鎖のインドル環が露出していた。

測定対象の分子 (キチン結合ドメイン) に対して基質である可溶性キチン (6 単糖) を加えると、それらが相互作用している部分の微視的な磁気環境が変化し化学シフト値が変化する。この現象を利用してキチン結合ドメインが 6 単糖と相互作用している部位を同定した。その結果、分子表面に側鎖が露出している 2 つのトリプトファンを中心に

して振動が観測された。また、基準となるスペクトルに対して6単糖を順次添加して得た滴定スペクトルを解析することにより、振動を受けた化学シフト値の移動距離から解離定数を求めた。

アミド ^{15}N 核の磁化の緩和時間の測定、model free 解析を行い、分子のナノ秒からピコ秒の運動性を示すオーダーパラメーター (S^2) を求めた。その結果、キチン結合ドメインはN末端、C末端を除いてほとんど全ての残基の S^2 が0.8を上回っており、この時間領域での分子内部の運動性が少ない構造を持つことが分かった。

すでに構造が知られているキチナーゼ A1 キチン結合ドメイン ($\text{ChBD}_{\text{ChiA1}}$)、セルロース結合ドメイン (CBD_{EGZ}) との構造比較を行った。この結果、主鎖の構造は同じ形態を示しているが、分子表面に存在する芳香環側鎖が $\text{ChBD}_{\text{ChiA1}}$ では0個、 CBD_{EGZ} では3個であり、今回決定した構造に存在していた2個とは異なっていた。

論文審査の結果の要旨

放線菌 *Streptomyces griseus* 由来キチナーゼ C は、キチン結合ドメインに細菌型、キチン分解活性ドメインに植物型のドメインをもつキメラ的なキチナーゼとして初めて同定されたものである。学位申請者は、このキチン結合ドメインの溶液構造を決定し、可溶性オリゴキチンとの相互作用の解析から、このキチン結合ドメインがどのように基質を認識するかを立体構造の観点から明らかにすることをめざした。 ^{15}N , ^{13}C の安定同位体でラベルしたキチン結合ドメインを発現、精製し、一連の多核共鳴多次元 NMR 測定によって、各原子の化学シフト値の帰属を行い、核間距離情報、二面角情報、水素結合情報を得た。590 個の距離制限、及び 92 個の二面角度制限をもとに構造計算を行い、主鎖の重原子の重ね合わせにおいて RMSD が $0.19 \pm 0.05 \text{ \AA}$ とよく収束した構造を得ることに成功した。アミド ^{15}N 核の磁化の緩和時間測定により分子の運動性を解析し、キチン結合ドメインはN末端、C末端を除いて分子内部の運動性が少ない構造を持つことを見いだした。さらに、キチン結合ドメインに対して可溶性キチンを添加し、それらが相互作用している部位を同定した。その結果、分子表面に側鎖が露出している2つのトリプトファンを中心にして振動をみいだした。これらを基にキチン結合時における認識機構について考察し、キチン・セルロース分解酵素類の新しい分類を提案した。

本研究はキチナーゼ C キチン結合ドメインの溶液中での構造を決定し、その基質であるオリゴ糖との相互作用を立体構造の観点から明らかにすることにより、糖と蛋白質の結合様式の解明に重要な寄与をするものである。よって本論文は博士(理学)の学位論文として十分な価値があるものである。